

RP-HPLC 法制备银杏酸的研究

张 鉴¹, 王 兰², 袁成凌¹, 王相勤¹, 余增亮^{*}

(1. 中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230022)

摘要: 目的 研究 5 种银杏酸单体的 RP-HPLC 制备分离条件。方法 将银杏外种皮的环己烷提取物经过预处理, 采用 HPLC-MS 鉴定, RP-HPLC 分离, 制备银杏酸单体。结果 该制备方法所得的 5 种银杏酸单体纯度超过 98%。结论 通过 HPLC-MS 检测确定银杏总酚酸不同物质的出峰位置, 在制备柱上可以获得多种银杏酸单体, 分离产物达到该类产品检测用对照物质的质量要求。

关键词: 银杏; 银杏酸; 制备高效液相色谱; 质谱

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2004)11-1238-02

Preparation of ginkgolic acids by RP-HPLC

ZHANG Jian¹, WANG Lan², YUAN Cheng-ling¹, WANG Xiang-qin¹, YU Zeng-liang¹

(1. Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

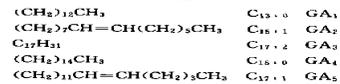
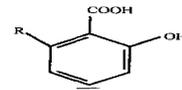
2. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230022, China)

Key words: *Ginkgo biloba* L.; ginkgolic acids; prepared-HPLC; MS

银杏类制剂是近年治疗心脑血管类疾病的主要药物, 在欧美销量排于植物药首位, 其质量指标中致敏物质银杏酚酸类成分的检测, 由于长期缺少该类物质对照品, 无法有效地展开相关质量指标检测工作^[1]。银杏酚酸类成分属于漆树酸类物质, 在 6 位取代有饱和或不饱和长链烷基的水杨酸, 结构见图 1^[2]。由于它们结构相似, 性质相近, 采用常规硅胶柱色谱分离需要通过多步纯化才可得纯度较高的标准物质^[3]。本研究中将银杏外种皮的环己烷提取物经预处理, 得到具有较高含量的银杏总酚酸后, 采用 HPLC-MS 联用, 判断色谱峰对应的结构, 再根据判断结果, 使用制备型 RP-HPLC 分离, 收集相应色谱峰, 制备多种银杏酸单体。

1 仪器与试剂

Finnigan Advantage LC-MS, Surveyor LC System (PDA, Autosample, Pump), Xcalibur 色谱工作站, Mass Frontier 质谱分析工作站, Waters Prep-LC4000 制备泵, Millennium 32 工作站, Waters 486 检测器。甲醇、环己烷、石油醚为分析纯, 流动相用甲醇为色谱纯。硅胶为柱色谱用, 100~200 目。银杏白果外种皮购自江苏省邳州, 经安徽省药品检验所刘信顺鉴定为银杏 *Ginkgo biloba* L. 干燥成熟果实的外种皮。



$(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	C_{13-0}	GA ₁
$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	C_{15-1}	GA ₂
$\text{C}_{17}\text{H}_{31}$	C_{17-2}	GA ₃
$(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	C_{15-0}	GA ₄
$(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	C_{17-1}	GA ₅

图 1 银杏酸结构式

Fig. 1 Structures of ginkgolic acids

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 分析条件: 色谱柱: Waters Delta Pak (150 mm × 3.9 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; PAD 检测波长: 310 nm; 流动相: 1% HAc 水-甲醇 (7:93); 体积流量: 0.8 mL/min; 进样量: 1 μL。质谱条件: 分流比 5:1; 毛细管温度: 300 °C; 喷雾电压: 5 kV; 鞘气(氮气)体积流量: 20 L/min; 毛细管电压: 38 V。

2.1.2 制备条件: Waters Delta Pak 柱 (300 mm × 19 mm, 15 μm); 流动相: 1% HAc 水-甲醇 (10:90); 体积流量: 12 mL/min; 进样量: 500 μL; Waters 486 检测器检测波长: 310 nm。

2.2 供试品溶液制备: 取干燥的外种皮 3 kg 粉碎,

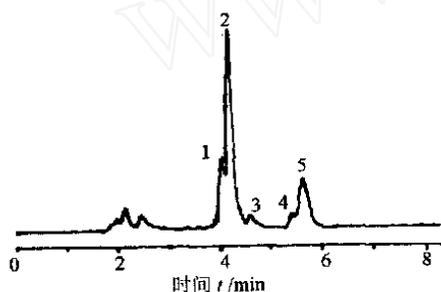
* 收稿日期: 2004-01-13

基金项目: 安徽省“十五”中药产业化专项(01803027)

作者简介: 张 鉴(1971—), 男, 陕西西安人, 博士, 研究方向为天然产物和发酵产物活性成分的研究及基因工程产品的分离纯化。

Tel: (0551) 5593096 E-mail: shangxia@mail.hf.ah.cn

用 20 L 环己烷水浴回流提取 3 次, 滤过, 减压回收, 得棕黑色油状浸膏 150 g。将浸膏用甲醇-水(30:70) 5 L 超声溶解, 离心, 用氯仿 5 L 分 3 次萃取, 经超速离心机离心(10 000 r/min)后, 合并氯仿层, 弃去甲醇水溶液, 浓缩氯仿萃取液得棕黄色浓缩液 200 mL。将所得浓缩液拌以硅胶, 放入 40 ℃ 烘箱中, 抽真空挥去氯仿后, 上硅胶柱(50 mm × 250 mm)用石油醚洗脱, 得到淡黄色洗脱液。回收石油醚后得到富集的银杏总酚酸浓缩液 50 mL。用甲醇超声溶解银杏总酚酸, 微孔滤膜滤过后得到银杏总酚酸甲醇溶液, 作为制备色谱供试品溶液, 其中银杏总酚酸质量分数约为 80%。该溶液色谱分析谱图见图 2。银杏酸质谱数据见表 1, 与文献对照确定相应物质^[3]。



1-GA₁ 2-GA₂ 3-GA₃ 4-GA₄ 5-GA₅

图 2 银杏总酚酸的 HPLC 图

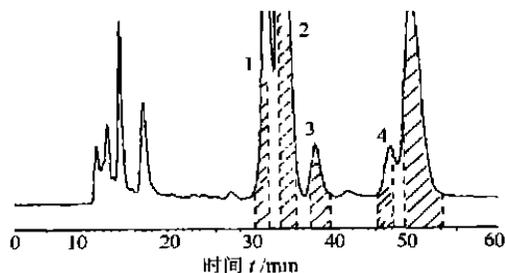
Fig. 2 HPLC chromatogram of total ginkgolic acids

表 1 银杏酚酸 HPLC-MS 检测结果

Table 1 Determination of ginkgolic acids by HPLC-MS

成分	保留时间/min	[M-H]
GA ₁	4.07	319.2
GA ₂	4.21	345.3
GA ₃	4.58	373.3
GA ₄	5.40	347.2
GA ₅	5.71	373.2

2.3 制备色谱分离: 将所得银杏总酚酸甲醇溶液每次进样 500 μL, 分离时间为 60 min, 制备谱图见图 3。阴影为馏份收集器收集的部分, 收集液浓缩后在相同的制备条件下重复进样以增加产物的纯度。经检验所得 5 种银杏酚纯度均超过 98%。



1-GA₁ 2-GA₂ 3-GA₃ 4-GA₄ 5-GA₅

图 3 制备高效液相色谱分离银杏酚酸色谱图

Fig. 3 Chromatogram of ginkgolic acids by prepared HPLC

3 讨论

实验中对白果外种皮采用环己烷直接粗提, 减少了黄酮和多糖等水溶性和醇溶性杂质在粗提物中的含量。采用硅胶柱吸附, 石油醚洗脱进一步减少其他成分的含量, 在流出液中富集银杏酚酸类物质。

由于植物药成分复杂, 在难以获得对照品的情况下, 较难判断液相色谱峰对应的成分, 所以在研究中使用分析柱初步分析, 通过质谱检测, 得到峰位的一些基本的结构信息, 判断未知峰的结构情况, 确定分离目标峰位, 再通过使用同类型制备色谱柱放大, 可以准确地分出目标成分, 并且一次可以获得多个目标成分, 相对增加了一个分离单元的对照品制备量, 减少了制备成本。

制备色谱分离时要综合考虑分离度和载样量, 由于制备色谱进样量较大, 一般分离度不如分析色谱, 在实验中采用峰位切割的收集方法, 得到不同时间段的流出液, 浓缩后再循环进样, 得到高纯度的单体物质。

References

[1] Siegers C P. Cytotoxicity of alkylphenols from *Ginkgo biloba* [J]. *World Phytother*, 1999, 6(4): 281-283.
 [2] Verotta L, Peterlongo F. Selective extraction of phenolic components from *Ginkgo biloba* extracts using supercritical CO₂ and on-line capillary gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 1993, 4: 178-182.
 [3] Teris A, van Beek, Martijn S. W. Intermans preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 930: 109-117.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022) 27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青